

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2004 年 6 月 24 日 (24.06.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/052416 A1

(51) 国際特許分類: A61L 27/00, 27/36

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/015914

(22) 国際出願日: 2003 年 12 月 11 日 (11.12.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2002-360094
2002 年 12 月 12 日 (12.12.2002) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 国立循環器病センター総長が代表する日本国 (JAPAN AS REPRESENTED BY THE PRESIDENT OF NATIONAL CARDIOVASCULAR CENTER) [JP/JP]; 〒565-8565 大阪府吹田市藤白台 5-7-1 Osaka (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 藤里 俊哉 (FUJISATO, Toshiya) [JP/JP]; 〒565-8565 大阪府吹田市藤白台 5-7-1 国立循環器病センター内 Osaka (JP). 岸田 晶夫 (KISHIDA, Akio) [JP/JP]; 〒565-8565 大阪府吹田市藤白台 5-7-1 国立循環器病センター内 Osaka (JP). 船本 誠一 (FUNAMOTO, Seichi) [JP/JP]; 〒565-8565 大阪府吹田市藤白台 5-7-1 国立循環器病センター内 Osaka (JP). 中谷 武嗣 (NAKATANI, Takeshi) [JP/JP]; 〒565-8565 大阪府吹田市藤白台 5-7-1 国

立循環器病センター内 Osaka (JP). 北村 惣一郎 (KITAMURA, Soichiro) [JP/JP]; 〒565-8565 大阪府吹田市藤白台 5-7-1 国立循環器病センター内 Osaka (JP).

(74) 代理人: 赤岡 迪夫, 外 (AKAOKA, Michio et al.); 〒541-0047 大阪府大阪市中央区淡路町 2 丁目 1 番 13 号 弘栄ビル Osaka (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: METHOD OF TREATING BIOLOGICAL TISSUE BY MICROWAVE-IRRADIATION

(54) 発明の名称: マイクロ波照射による生体組織の処理方法

(57) Abstract: A method of efficiently achieving the removal or immobilization of donor cells from an animal-origin biological tissue which comprises microwave-irradiating the animal-origin biological tissue immersed in a treating solution while maintaining at a temperature of 0°C to 40°C.

(57) 要約: 動物由来の生体組織からドナー細胞を除去または固定化する処理を効果的に達成する方法は、処理液中に浸漬した動物由来の生体組織に対し、0°C~40°Cの温度を維持しながらマイクロ波を照射することを含む。

明 細 書

マイクロ波照射による生体組織の処理方法

〔技術分野〕

本発明は、再生医療、すなわち正常に機能しない患者自身の器官や組織に代って移植し、正常な機能を回復させる医療技術の分野に関する。詳しくは、動物由来の生体組織から細胞成分を取り去るか、または典型的にはグルタルアルデヒドである固定剤を用いて組織を固定することによって移植用組織片を作成する方法に関する。

〔背景技術〕

生体組織をグルタルアルデヒドのような固定剤によって化学処理することによって、あるいは生体組織から細胞成分を取り去ることによって移植用組織片が作成され、広く臨床応用されている。例えば心臓弁置換術において、異種生体弁はブタ心臓弁あるいはウシ心臓膜を免疫原性の低下のためにグルタルアルデヒドで固定化したものである。この異種生体弁は抗凝固性に優れてはいるが、若年者では5～10年程度の耐久性しかなく、通常は60歳以上の高齢者への適用とされる。欧米では1985年頃から、我が国でも近年、凍結保存による組織バンクが整備されたことで、死体から提供された凍結保存同種弁が臨床で使用されつつある。この同種弁は機械弁に比べて抗血栓性で、異種生体弁に比べて耐久性で、そして抗感染性で優れているとされる。しかしながら、提供数が絶対的に不足しているのが大きな問題である。また、若年者では比較的早期に機能不全を来す症例も報告されており、免疫反応の関与が強く示唆されてい

る。若年者に有効とされる R o s s 手術では、自己肺動脈弁を大動脈弁位に置換移植し、欠損した肺動脈弁を凍結保存同種弁によって再建するが、大動脈弁位に移植された自己肺動脈弁は患者の成長とともに増大するという特徴がある。これに対して、機械弁や異種生体弁はもとより、凍結保存同種弁でも成長性を有しないため、小児患者の場合では再移植となる場合が少なくない。最近、これらの問題を解決するために、同種弁からドナー由来細胞を除去することで抗原性の減弱によって免疫反応の関与を低下させることで、耐久性及び自己化を向上させる研究の報告がなされてきた。米国 C r y o L i f e 社は S y n e r G r a f t と称する薬液処理による細胞除去方法を発表しており、移植後数ヶ月間で自己細胞が組織内に浸潤し、自己組織化すると報告している。また、ドイツ・ハノーバー医科大学の H a v e r i c h らのグループは、界面活性剤である T r i r o n X - 1 0 0 やタンパク分解酵素であるトリプシン溶液を細胞除去に用いている。しかしながら、従来の界面活性剤あるいは薬液のみによる洗浄工程だけでは、組織片内部の細胞成分および細菌やウイルスの除去は薬液の表面からの拡散および浸透によるため、十分ではない。また、このような制約のため、大型の組織片の処理については完全な細胞除去や細菌、ウイルス除去が困難であった。また、化学処理による場合では、十分な効果を得るためには処理の度合いを高める必要があり、それによって埋入後の石灰化や処理試薬の除去などの問題が生じる。さらに、硬膜移植における B S E 及び C J D の感染で明らかとなったように、移植組織の安全性確保は極めて重要であるが、現在の化学薬液処理においては、組織内のウイルスを完全に不活化できるとの保証が得られていない。また、処

理過程における汚染によって、移植用組織からの感染事故もしばしば発生している。

また、細胞成分を取り去った異種または同種の移植用組織片は、これに患者自身の細胞を播種し、細胞片内で自家細胞を増殖させ、ハイブリッド再生組織として移植するためにも利用される。

〔発明の開示〕

本発明の目的は、上記のような従来技術の問題点を改善することにある。すなわち、まず第1に、薬液処理では達成できない大型組織内部の細胞成分および細胞やウイルスの除去を達成すること、第2に、処理組織の生体力学特性を損なうことなく処理を行うこと、第3に、簡便かつ短時間に処理を行うことである。

本発明は、処理液中に浸漬した動物由来の生体組織に対し、0℃～40℃の温度を維持しながらマイクロ波を照射することを特徴とする生体組織の処理方法を提供する。

〔図面の簡単な説明〕

図1 本発明を実施するための装置の一例を示す概略図。

図2 ブタ心臓弁組織の組織断面写真。左が従来法による処理、右がマイクロ波照射を併用した本発明による処理を示す。従来の処理では組織深部（写真の左下）内では細胞核の残存が認められる。

図3 トリトンX-100にて細胞除去したブタ心臓弁からのトリトンX-100の除去効率を示すグラフ。マイクロ波照射による本発明方法では従来法の約10分の1の時間でトリトンX-100を除去することが可能であった。

〔発明を実施するための最良の形態〕

本発明の方法は、生体組織から細胞成分を除去し、移植用組織片

を作成する処理に適用することができる。この場合は、処理液として水、高張液、低張液、界面活性剤溶液、酵素液、媒地、または少割合の有機溶媒を含んでいるこれらの液体が使用される。

本発明の方法を組織を固定し、移植用組織片を作成する処理に適用する場合は、グルタルアルデヒドのような化学的固定剤の溶液を使用する。

いずれの処理においても、マイクロ波を照射しない従来の方法では、処理液は試料表面からの拡散および浸透によって全体に行きわたるので、長時間の処理が必要であり、この間に試料の汚染等の危険もあった。マイクロ波の照射は処理液が組織深部まで浸透に要する時間をこれまでの約 10 分の 1 に短縮することができるので、処理の効率を大幅に高めることができ、その間の試料の汚染等を防止することができる。また、組織から細胞を除去して移植片を作成する場合、これまでの方法では不可能ないし困難であった組織深部からの細胞核の除去を短時間で達成することが可能になる。

マイクロ波処理は病理組織学分野において、組織の固定、骨の脱灰、脱脂、免疫組織化学等に応用されている。しかしながら、マイクロ波照射を移植用組織片の作成に適用した事例はない。本発明の新しい生物由来組織の処理法においては、マイクロ波を透過するガラスあるいはプラスチック製の試料容器内に処理試料を入れ、細胞除去処理においては界面活性剤や低調液、高調液などの処理液を、細胞固定処理においてはグルタルアルデヒド等の化学固定液を、試料が完全に漬かるよう注ぐ。処理試料の温度を 0 ～ 40℃ 内にコントロールしながらマイクロ波を照射するが、一般にマイクロ波を照射すると試料温度が上昇するため、長時間マイクロ波を照射するに

は試料を冷却しなければならない。これには、例えば市販のマイクロウェーブ迅速試料処理装置の使用が有効である。この装置を、マイクロ波を照射するための電子レンジオープン内の試料容器周囲に、電子レンジ外部の冷却装置によって冷却された不凍液を循環させるように改造して用いる。試料容器内に温度センサを設置し、冷却装置及びマイクロ波照射時間を間欠的に制御することで、マイクロ波照射時における試料温度を 0 ～ 40℃ にコントロールすることが可能である。病理組織学分野と異なり、移植用生体組織の場合は、生体力学特性を変化させないために、構成マトリックスの変性を防ぐ必要があり、マイクロ波照射時において温度が氷点以下や 40℃ 以上になることを避けなければならない。

図 1 は、本発明を実施するための装置の一例を示す概略図である。装置は、マグネトロン 12 を備えた電子レンジオープン 1 よりなる。オープン内部には、冷却用不凍液 21 を収容した冷却槽 2 が設置されており、冷却槽 2 のほぼ中央に試料容器 3 が置かれる。試料容器 3 は処理液で満たされ、その中に試料すなわち処理しようとする生体組織 4 が浸漬される。冷却槽 2 および試料容器 3 はガラスやプラスチック例えばポリプロピレン、ポリスチレン等のマイクロ波を透過する材質でつくられる。先に述べたようにマイクロ波の照射は処理液 31 従って試料 4 を加熱し、試料の構成マトリックスを不可逆的に熱変性させるので、冷却槽 2 内の冷却液 31 をオープン 1 の外に設置した冷却装置 7 と冷却槽 2 の間を導管 5, 6 を通って循環させる必要がある。そのため冷却槽 21 で暖められた冷却液 21 は導管 6 を通って冷却装置の熱交換器 72 へ返還され、再び冷却された後導管 5 を通って冷却槽 21 へポンプ 71 によって戻される。

槽 2 1 内の冷却液の温度をセンサー 1 1 によって感知し、該温度が 0℃～40℃の範囲内の一定温度例えば 20℃に維持されるように、コントローラー 1 3 によってマグネトロン 1 2 の作動時間を間歇的かつ自動的に制御する。マイクロ波を均等に照射するために攪拌ファンその他の手段を設置することもできる。

本発明方法は、組織から細胞成分を除去するための既知の方法と組合せて使用することもできる。例えば界面活性剤や酵素を使用して組織内の細胞を除去する前処理を行った後、組織片に残っている薬液を除去する洗浄をマイクロ波照射下に行うことができる。

本発明方法の利用分野または用途は、

1) 移植用動物由来軟組織

例：脳死あるいは心臓死ドナーからの移植用軟組織処理、もしくはブタ、ウシ等の異種動物からの移植用軟組織処理から細胞成分を除去する洗浄処理工程の効率を飛躍的に高めることができる。また、抗原性原因物質の大幅な減少が達成できる。

2) 移植用動物由来硬組織

例：上記と同様に、骨・軟骨・歯などの硬組織処理を行うことができる。

3) 医療用生物組織の処理

例：動物および植物由来組織のうち、細胞を含んだものについての細胞破壊処理に用いることができる。

実施例

1. 食用ブタ繁殖場からブタ心臓を購入し、4℃にて搬送した。心臓摘出時における温阻血時間は20分以内とした。肺動脈弁、血管を摘出し、ハンクス液で洗浄した。界面活性剤であるトリトンX-

100の1%水溶液に試料を浸漬し、図1に概略図で示した装置にて20℃でマイクロ波を48時間間欠的に照射し、ドナー細胞を除去した。処理後、リン酸緩衝生理食塩水にて洗浄除去した。処理標本の組織断面をHE染色により顕微鏡観察することで、組織学的に評価した。その結果、ブタ肺動脈弁葉組織では、図2に示すようにマイクロ波照射を併用すると、併用しない場合と比較してより組織深部まで細胞を除去することができた。

2. 同様に食用ブタ繁殖場から購入したブタ心臓弁を、界面活性剤であるトリトンX-100の1%水溶液中に24時間浸漬することで細胞除去した。その後、リン酸緩衝生理食塩水に浸漬し、10℃下にてマイクロ波処理を間欠的に48時間照射した。その結果、図3に示すように、マイクロ波を照射しない従来法では細胞毒性を示すトリトンX-100溶液を除去するために3週間程度必要であったのが、マイクロ波を照射することで数日間と大幅な処理時間の短縮が可能であった。

請 求 の 範 囲

1. 処理液中に浸漬した動物由来の生体組織に対し、0℃～40℃の温度を維持しながらマイクロ波を照射することを特徴とする生体組織の処理方法。
2. 前記処理は、生体組織から細胞成分を除去するための処理であり、処理液は水、高張液、低張液、界面活性剤溶液、酵素液、媒地、または少割合の有機溶媒を含んでいるこれらの液体である請求項1の方法。
3. 前記処理は、生体組織を固定するための化学処理であり、処理液はグルタルアルデヒドを含む薬液である請求項1の方法。
4. 前記マイクロ波照射は、周波数2450MHzにおいて正味照射時間として1時間ないし1週間行われる請求項1ないし3のいずれかの方法。
5. 処理される生体組織は、血管、心臓弁膜、心膜、角膜、羊膜、および硬膜を含む軟組織である請求項1ないし4のいずれかの方法。
6. 処理される生体組織は、骨、軟骨、および歯を含む軟または硬組織である請求項1ないし4のいずれかの方法。
7. 処理される生体組織は、心臓、腎臓、肝臓、脾臓、および脳を含む臓器もしくはその一部である請求項1ないし4のいずれかの方法。
8. マイクロ波照射後、新鮮な洗浄液を用いて破壊されたドナー細胞を組織から洗浄除去する工程を含む請求項2の方法。
9. 処理される生体組織は、ドナー細胞の除去を容易にする前処

理を受けている請求項 2 の方法。

図 1

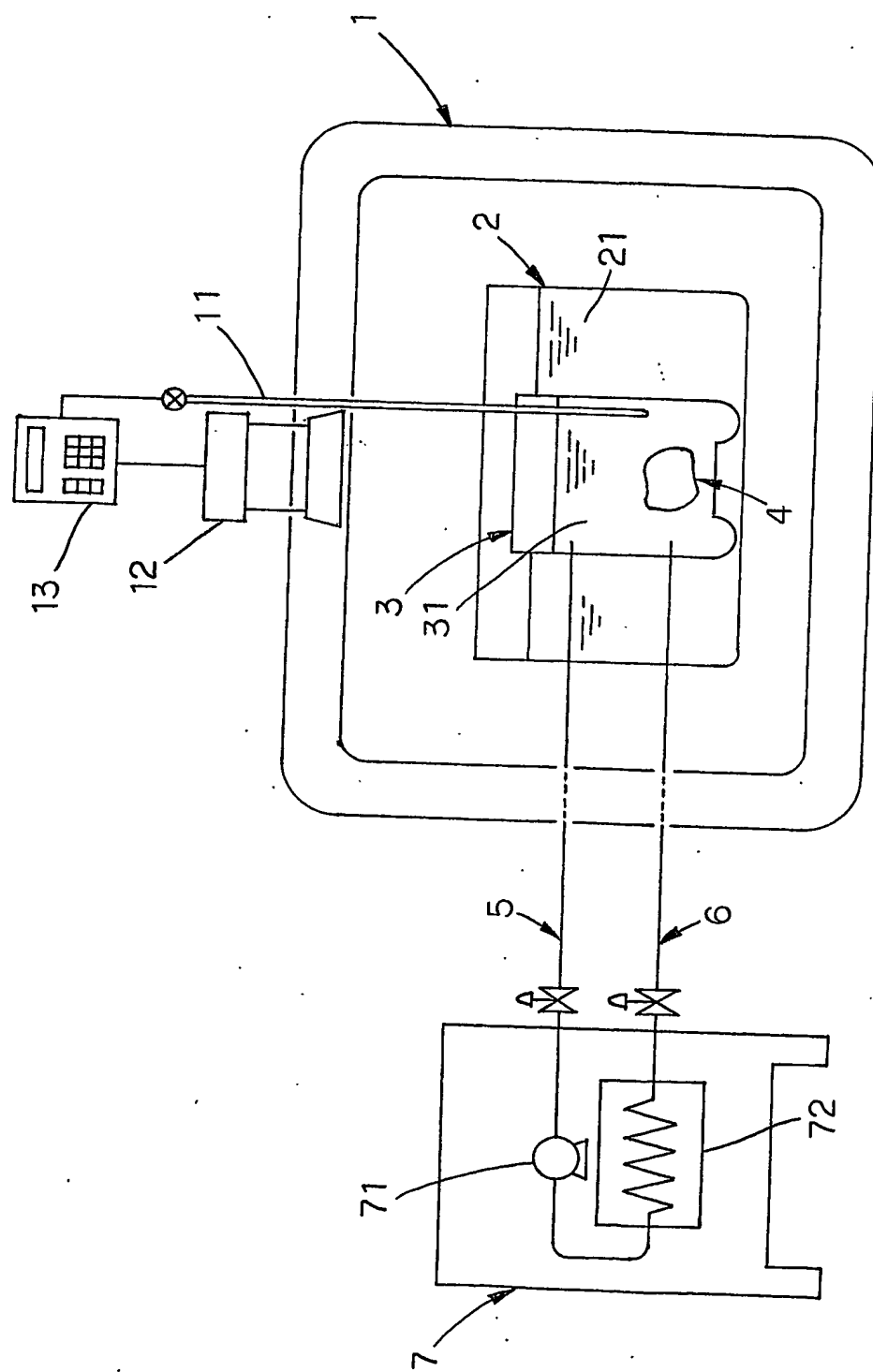


図 2

BEST AVAILABLE COPY

BEST AVAILABLE COPY

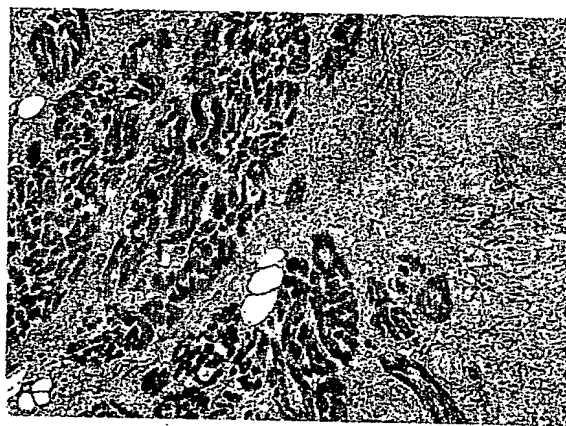
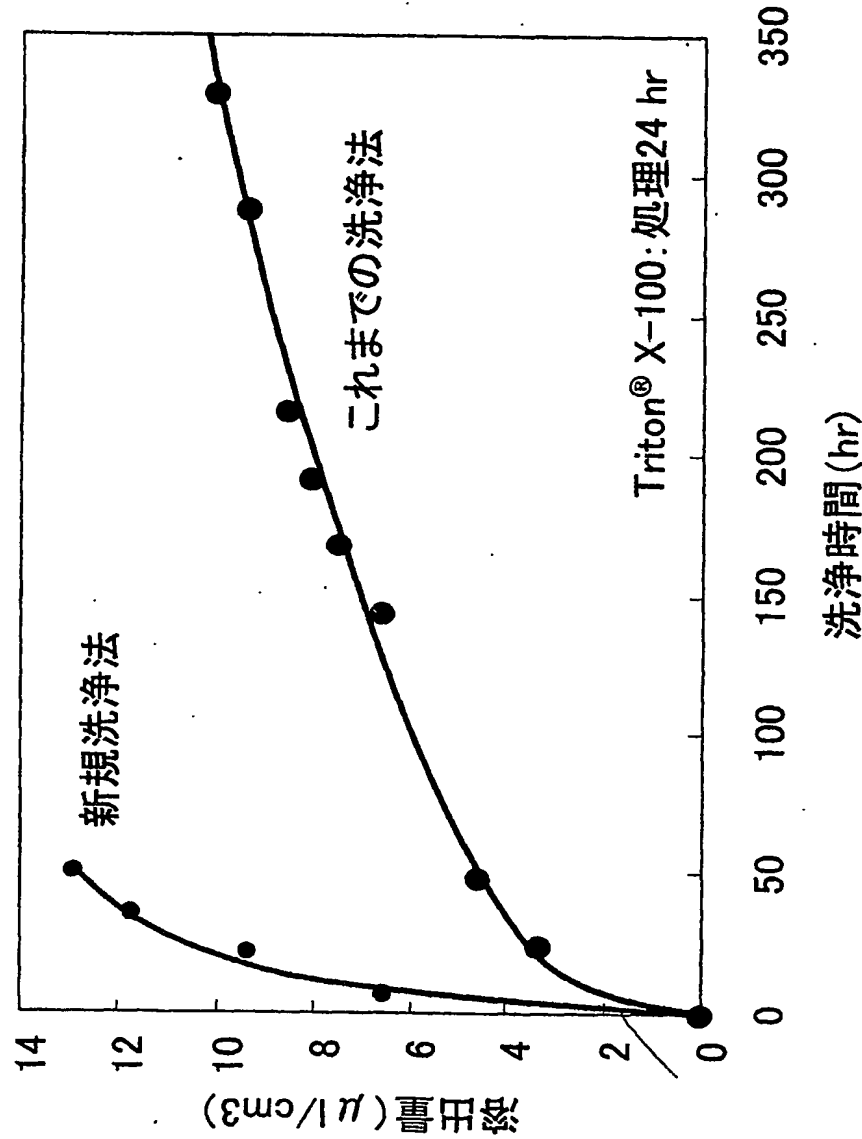


図 3



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP03/15914

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A61L27/00, 27/36

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁷ A61L27/00, 27/36

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Jitsuyo Shinan Koho 1926-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2004
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2004 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2004

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAPLUS/MEDLINE/BIOSIS/EMBASE (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	JP 04-288165 A (Terumo Corp.), 13 October, 1992 (13.10.92), Claim 1; Par. Nos. [0016] to [0018], [0025] (Family: none)	1, 3-7 2, 8, 9
Y	WO 00/35374 A1 (AV HEALING LLC.), 22 June, 2000 (22.06.00), Page 12, lines 8 to 13 & AU 200024799 A & CN 1330528 A & EP 1139911 A1 & JP 2002-532134 A & US 6106555 A	2, 8, 9

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
02 March, 2004 (02.03.04)

Date of mailing of the international search report
16 March, 2004 (16.03.04)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61L27/00, 27/36

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61L27/00, 27/36

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1926-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2004年
日本国実用新案登録公報	1996-2004年
日本国登録実用新案公報	1994-2004年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS/MEDLINE/BIOSIS/EMBASE (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	JP 04-288165 A (テルモ株式会社) 1992. 10. 13, 請求項1、【0016】～【0018】、【0025】段落等参照 (ファミリーなし)	1, 3-7 2, 8, 9
Y	WO 00/35374 A1 (AV HEALING LLC) 2000. 06. 22, 第12頁第8～13行参照 & AU 200024799 A & CN 1330528 A & EP 1139911 A1 & JP 2002-532134 A & US 6106555 A	2, 8, 9

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

02. 03. 2004

国際調査報告の発送日

16. 3. 2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)
郵便番号100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)
富永 保

4C 3039

電話番号 03-3581-1101 内線 3452